

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re U.S. Patent Application of)
)
KOMATSU et al.)
)
Application Number: To be Assigned)
)
Filed: Concurrently Herewith)
)
For: SUBSTRATE FOR IMMOBILIZATION OF A)
BIOLOGICAL SUBSTANCE OR CHEMICAL)
SUBSTANCE, METHOD OF IMMOBILIZING A)
BIOLOGICAL SUBSTANCE OR CHEMICAL)
SUBSTANCE, AND METHOD OF COATING A)
SUBSTRATE)
)
ATTORNEY DOCKET NO. HIRA.0116)

**Honorable Assistant Commissioner
for Patents
Washington, D.C. 20231**

**REQUEST FOR PRIORITY
UNDER 35 U.S.C. § 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

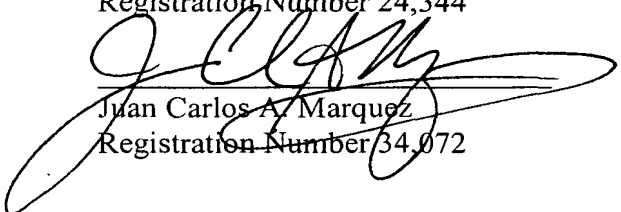
Sir:

In the matter of the above-captioned application for a United States patent, notice is hereby given that the Applicant claims the priority date of June 28, 2002, the filing date of the corresponding Japanese patent application 2002-189554.

A certified copy of Japanese patent application 2002-189554, is being submitted herewith. Acknowledgment of receipt of the certified copy is respectfully requested in due course.

Respectfully submitted,

Stanley P. Fisher
Registration Number 24,344



Juan Carlos A. Marquez
Registration Number 34,072

REED SMITH LLP
3110 Fairview Park Drive
Suite 1400
Falls Church, Virginia 22042
(703) 641-4200
June 24, 2003

(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of
the following application as filed with this Office.

Date of Application: June 28, 2002

Application Number: Japanese Patent Application
No. 2002-189554

Applicant(s): DNA Chip Research Inc.
Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

April 18, 2003

Commissioner,
Patent Office

Shinichiro OTA (seal)

Certificate No. 2003-3028767

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 6月28日

出 願 番 号
Application Number:

[ST.10/C]:

特願2002-189554

[JP2002-189554]

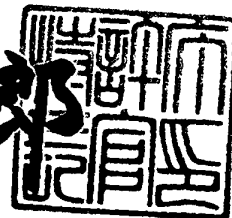
出 願 人
Applicant(s):

株式会社ディーエヌエイチップ研究所
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

2003年 4月18日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3028767

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 6月28日

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-189554

[ST.10/C]:

[JP2002-189554]

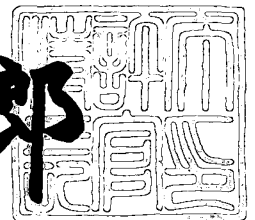
出 願 人
Applicant(s):

株式会社ディーエヌエイチップ研究所
日立ソフトウエアエンジニアリング株式会社

2003年 4月18日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3028767

【書類名】 特許願

【整理番号】 14A041

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明の名称】 生体関連物質または化学物質固定化用基盤、生体関連物質または化学物質の固定化方法、及び基盤のコーティング方法

【請求項の数】 22

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目 1 番地 4 3 株式会社
社 ディーエヌエイチップ研究所内

 【氏名】 小松 康雄

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目 1 番地 4 3 株式会社
社 ディーエヌエイチップ研究所内

 【氏名】 松原 謙一

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目 1 番地 4 3 株式会社
社 ディーエヌエイチップ研究所内

 【氏名】 大塚 栄子

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目 1 番地 4 3 株式会社
社 ディーエヌエイチップ研究所内

 【氏名】 野中 謙

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 8 1 番地 日立ソフト
ウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 百合野 以子

【特許出願人】

【識別番号】 501002172

【氏名又は名称】 株式会社 ディーエヌエイチップ研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000233055

【氏名又は名称】 日立ソフトウエアエンジニアリング株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100102576

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 敏章

【選任した代理人】

【識別番号】 100103931

【弁理士】

【氏名又は名称】 関口 鶴彦

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体関連物質または化学物質固定化用基盤、生体関連物質または化学物質の固定化方法、及び基盤のコーティング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基盤上に活性基含有カップリング剤を介して、下記一般式（1）

【化 1】

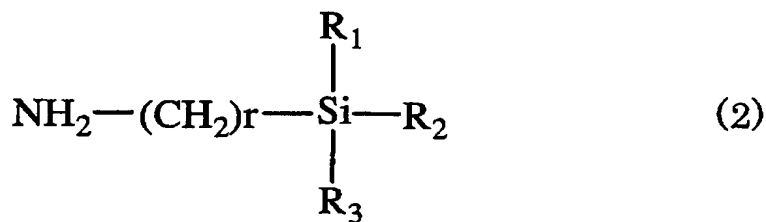


で示される架橋試薬が結合した基盤。

[式中、AおよびBは同一または異なる、活性エステル基、イソチオシアネート基、イソシアネート基、イミダゾール基、カルボジイミド基、アルデヒド基から選ばれ、上記活性基含有カップリング剤の活性基と反応する基を示す。LはAとBを連結する連結基であり、直鎖アルキル基、アリール基、アミド基を有するアルキル基から選ばれる。]

【請求項 2】 前記活性基含有カップリング剤が、下記一般式（2）

【化 2】

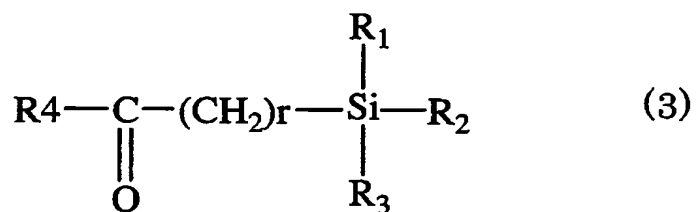


で示されるアミノ基含有シラン化合物であることを特徴とする請求項 1 に記載の基盤。

[式中、R 1、R 2、R 3 は、同一または異なる-0(CH₂)_aCH₃またはClを表し、a は同一または異なる 0 から 10 の整数を表し、r は 0 から 10 の整数を表す。]

【請求項 3】 前記活性基含有カップリング剤が、下記一般式（3）

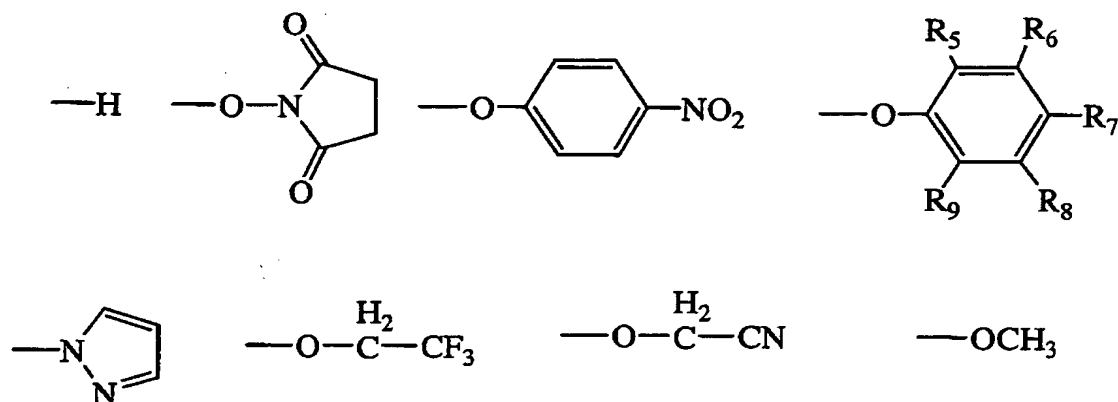
【化 3】



で示される活性基含有シラン化合物であることを特徴とする請求項 1 に記載の基盤。

[式中 R 4 は以下のいずれかの構造を表す。

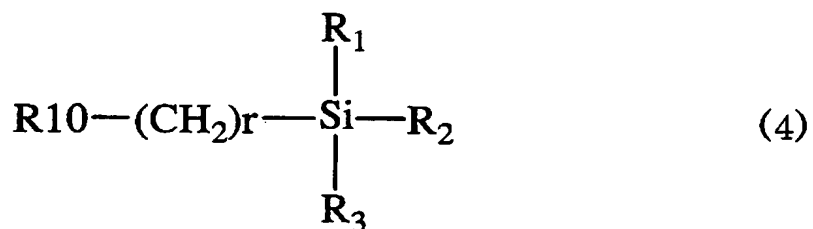
【化 4】



ここで、R 5、R 6、R 7、R 8、R 9 は同一または異なる H、C 1、F を表す。
。]

【請求項 4】 前記活性基含有カップリング剤が、下記一般式 (4)

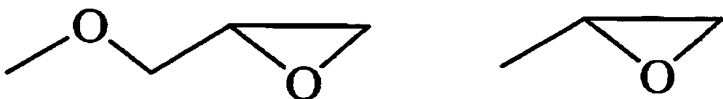
【化 5】



で示される活性基含有シラン化合物であることを特徴とする請求項 1 に記載の基盤。

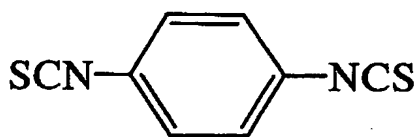
[式中、R 1 0 は以下のいずれかの構造を表す。]

【化 6】

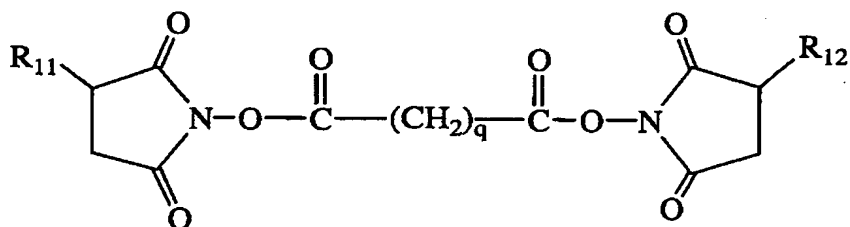


【請求項 5】 前記一般式 (1) の架橋試薬 A-L-B が、以下のいずれかであることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の基盤。

【化 7】

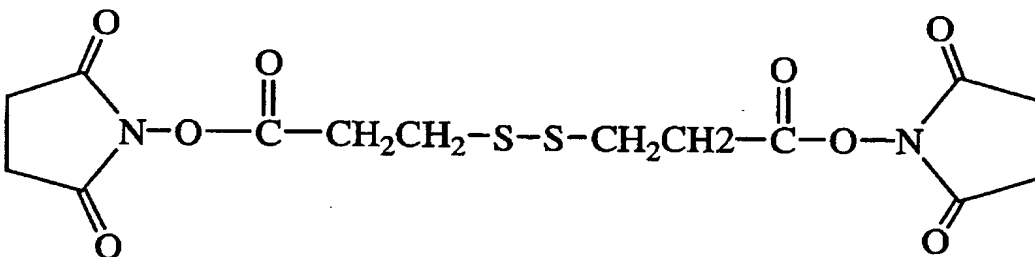


【化 8】

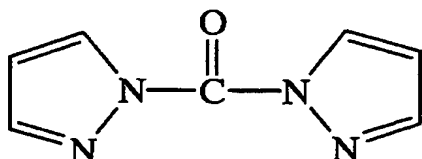


[R 1 1, R 1 2 は同一または異なる -H または -S O₃]

【化 9】



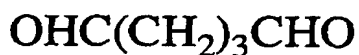
【化 1 0】



【化 1 1】



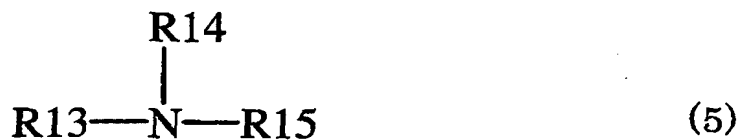
【化 1 2】



【請求項 6】 請求項 1～5 のいずれかに記載された基盤の一般式 (1) の A-L-B で示される架橋試薬を介して、分子中に一級アミノ基を 2 個以上有する分枝剤が結合した基盤。

【請求項 7】 前記分枝剤が、下記一般式 (5)

【化 1 3】

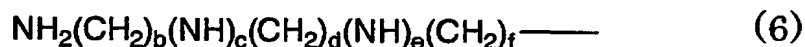


で示される一級アミノ基を 2 個又は 3 個有する化合物であることを特徴とする請求項 6 に記載の基盤。

[式中、R 1 3、R 1 4、R 1 5 は同一または異なる一級アミノ基を有するアルキル基、アルキル基、水素原子から選ばれる。ただし、2 個又は 3 個は一級アミノ基を有するアルキル基である。]

【請求項 8】 前記一般式 (5) の R 1 3、R 1 4、R 1 5 が、下記一般式 (6)

【化 1 4】



で表されるアルキルアミノ基であることを特徴とする請求項 7 に記載の基盤。

[式中、b、d、および f は同一または異なる 0 から 10 の整数を表し、c および e は同一または異なる 0 または 1 の整数を表す。ただし、b、d、f がいずれ

も 0 になる場合は含まれない。]

【請求項 9】 前記分枝剤が、多数の一級アミノ基を有するポリアミドデン
ドリマーであることを特徴とする請求項 6 に記載の基盤。

【請求項 10】 請求項 6 ～ 9 のいずれかに記載の基盤の分子中に一級アミ
ノ基を 2 個又は 3 個有する分枝剤を介して、更に、下記一般式 (1)

【化 1 5】



の架橋試薬を結合させたことを特徴とする基盤。

[式中、A および B は同一または異なる、活性エステル基、イソチオシアネート
基、イソシアネート基、イミダゾール基、カルボジイミド基、アルデヒド基から
選ばれ、上記活性基含有カップリング剤の活性基と反応する基を示す。L は A と
B を連結する連結基であり、直鎖アルキル基、アリール基、アミド基を有するア
ルキル基から選ばれる。]

【請求項 11】 請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の基盤の、一般式 (1)
A-L-B で示される架橋剤を介して、結合対象物である生体関連物質または化
学物質が固定化されることを特徴とする生体関連物質または医薬品固定化用基盤

【請求項 12】 請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の基盤に、生体関連物質
または化学物質を固定化することを特徴とする生体関連物質または医薬品固定化
方法。

【請求項 13】 基盤上に活性基含有カップリング剤を反応させ、続いて、
下記一般式 (1)

【化 1 6】



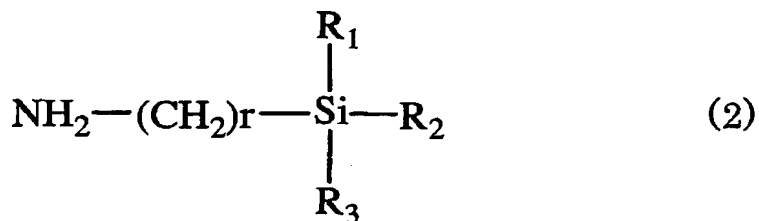
で示される架橋試薬を反応させることを特徴とする基盤のコーティング方法。

[式中、A および B は同一または異なる、活性エステル基、イソチオシアネート
基、イソシアネート基、イミダゾール基、カルボジイミド基、アルデヒド基から

選ばれ、上記活性基含有カップリング剤の活性基と反応する基を示す。LはAとBを連結する連結基であり、直鎖アルキル基、アリール基、アミド基を有するアルキル基から選ばれる。]

【請求項 1 4】 前記活性基含有カップリング剤が、下記一般式 (2)

【化 1 7】

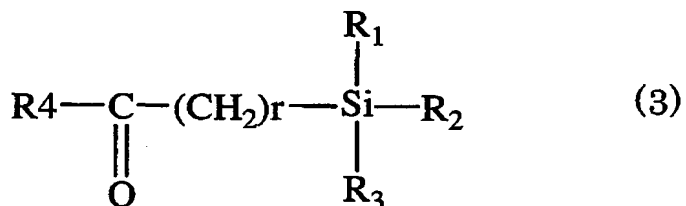


で示されるアミノ基含有シラン化合物であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の基盤のコーティング方法。

[式中、R 1、R 2、R 3 は、同一または異なる $-\text{O}(\text{CH}_2)_a\text{CH}_3$ またはClを表し、a は同一または異なる 0 から 1 0 の整数を表し、r は 0 から 1 0 の整数を表す。]

【請求項 1 5】 前記活性基含有カップリング剤が、下記一般式 (3)

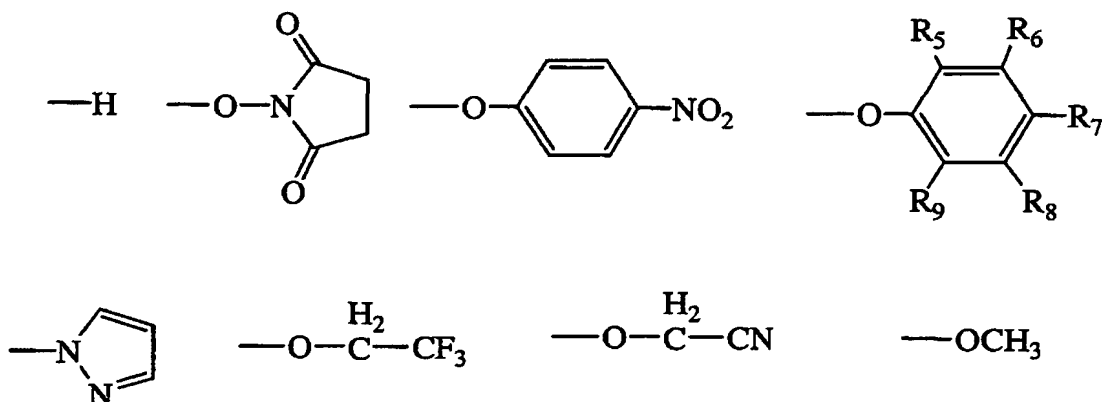
【化 1 8】



で示される活性基含有シラン化合物であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の基盤のコーティング方法。

[式中 R 4 は以下のいずれかの構造を表す。

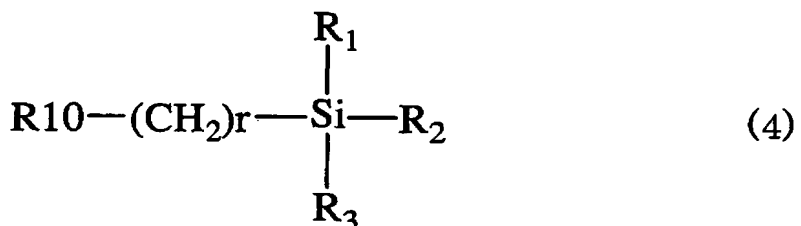
【化19】



ここで、R5、R6、R7、R8、R9は同一または異なるH、C1、Fを表す。
。]

【請求項16】 前記活性基含有カップリング剤が、下記一般式(4)

【化20】



で示される活性基含有シラン化合物であることを特徴とする請求項13に記載の
基盤のコーティング方法。

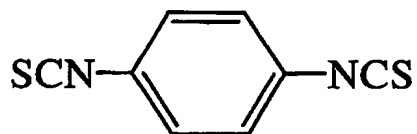
[式中、R10は以下のいずれかの構造を表す。]

【化21】

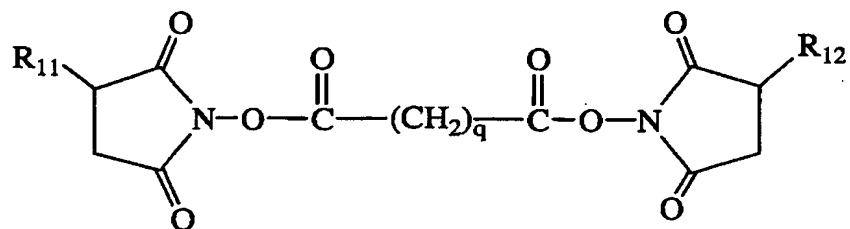


【請求項17】 前記一般式(1)の架橋試薬A-L-Bが、以下のいずれ
かであることを特徴とする請求項13～16のいずれかに記載の基盤のコーティ
ング方法。

【化 2 2】

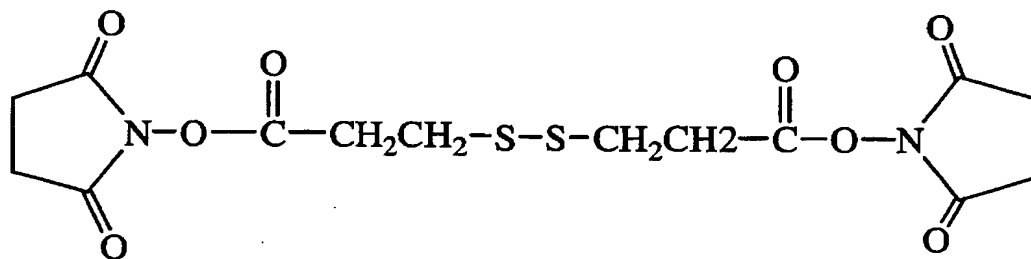


【化 2 3】

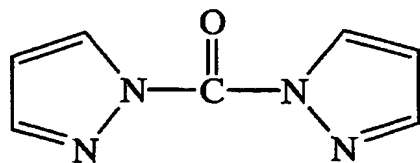


[R 1 1, R 1 2 は同一または異なる -H または -SO₃]

【化 2 4】



【化 2 5】



【化 2 6】



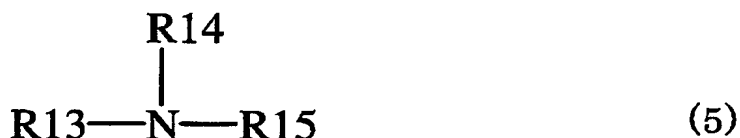
【化 2 7】



【請求項 1 8】 請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれかに記載された基盤に対し、分子中に一級アミノ基を 2 個以上有する分枝剤を反応させたことを特徴とする基盤のコーティング方法。

【請求項 1 9】 前記分枝剤が、下記一般式 (5)

【化 2 8】

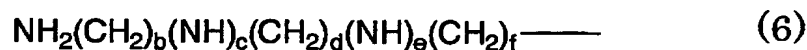


で示される一級アミノ基を 2 個又は 3 個有する化合物であることを特徴とする請求項 1 8 に記載の基盤のコーティング方法。

[式中、R 1 3、R 1 4、R 1 5 は同一または異なる一級アミノ基を有するアルキル基、アルキル基、水素原子から選ばれる。ただし、2 個又は 3 個は一級アミノ基を有するアルキル基である。]

【請求項 2 0】 前記一般式 (5) の R 1 3、R 1 4、R 1 5 が、下記一般式 (6)

【化 2 9】



で表されるアルキルアミノ基であることを特徴とする請求項 1 9 に記載の基盤のコーティング方法。

[式中、b、d、および f は同一または異なる 0 から 1 0 の整数を表し、c および e は同一または異なる 0 または 1 の整数を表す。ただし、b、d、f がいずれも 0 になる場合は含まれない。]

【請求項 2 1】 前記分枝剤が、2 個以上の一級アミノ基を有するポリアミド dendrimer であることを特徴とする請求項 1 8 に記載の基盤のコーティング方法。

【請求項 2 2】 請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれかに記載の基盤に対し、更に、下記一般式 (1)

【化 3 0】

A - L - B

(1)

の架橋試薬を反応させたことを特徴とする基盤のコーティング方法。

[式中、AおよびBは同一または異なる、活性エステル基、イソチオシアネート基、イソシアネート基、イミダゾール基、カルボジイミド基、アルデヒド基から選ばれ、上記活性基含有カップリング剤の活性基と反応する基を示す。LはAとBを連結する連結基であり、直鎖アルキル基、アリール基、アミド基を有するアルキル基から選ばれる。]

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ガラス、プラスチック、セラミック等をはじめとする固定基盤上に生体関連物質等を固定化することに適した基盤、それら生体関連物質等の基盤への固定化方法、及び基盤のコーティング方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

DNAチップには、長鎖PCR産物を基盤上に固定化したcDNAチップと、100塩基以下の鎖長よりなる一本鎖オリゴヌクレオチドを固定化したオリゴヌクレオチドチップがある。cDNAチップはPCR産物由来であるため、二本鎖DNAを固定化していることになり、検体由来のサンプルが、正しくないハイブリダイゼーション（交差ハイブリダイゼーション）を起こすことがある。

【0 0 0 3】

また、現在用いられているオリゴヌクレオチドチップには、オリゴヌクレオチドをガラス基盤上で合成する方法と、合成したオリゴヌクレオチドをガラス基盤上に固定化させる方法とに大別できる。チップ上でのオリゴヌクレオチド合成は、多種類のオリゴヌクレオチド合成が可能であるといった利点を有している。しかしながら、合成後のオリゴ精製を省いているため、純度が低いといった欠点を有している。また、このガラス上合成法では、一本鎖オリゴヌクレオチドのみし

か合成不可能である。今後 2 本鎖 DNA、糖、タンパク質などの生体関連物質を固定化したチップを作製するには、基盤上で合成する方法は適していない。そこで、合成したオリゴヌクレオチドをスポットする方法は、今後高い汎用性が求められると思われる。

【 0 0 0 4 】

ガラスに代表される基盤にある特殊なコーティングを施し、その基盤にオリゴヌクレオチドをスポットし、固定化する方法はいくつか報告されている。しかしながら、いずれもサンプルを標識するために用いる蛍光色素が基盤表面へ非特異的に吸着することに由来する高いバックグラウンド値が問題である。また、核酸を溶解する溶液の粘性が低すぎると、スポットされた液滴が広がりすぎるといったことも報告されている。そのため、スポットに用いる溶液開発も、高密度でスポットする場合は重要な課題となる。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

上記背景から、本発明の課題は、生体関連物質等をバックグラウンド値が低く、高密度に固定化するためのコーティングされた基盤、生体関連物質等をスポットして固定化する方法、及び基盤のコーティング方法を提供することにある。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明者等は、特定の連結基を用いて基盤をコーティングすることにより、バックグラウンド値が低く、高濃度に生体物質を固定化するための基盤を作製可能であることを見出した。

第 1 に、本発明の基盤は、基盤上に活性基含有カップリング剤を介して、下記一般式 (1)

【 0 0 0 7 】

【化 3 1】

A — L — B

(1)

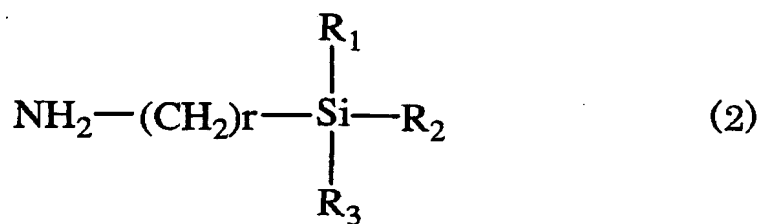
で示される架橋試薬が結合した基盤である。

[式中、AおよびBは同一または異なる、活性エステル基、イソチオシアネート基、イソシアネート基、イミダゾール基、カルボジイミド基、アルデヒド基から選ばれ、上記活性基含有カップリング剤の活性基と反応する基を示す。LはAとBを連結する連結基であり、直鎖アルキル基、アリール基、アミド基を有するアルキル基から選ばれる。]

前記活性基含有カップリング剤の具体例として、下記一般式(2)

【0008】

【化32】



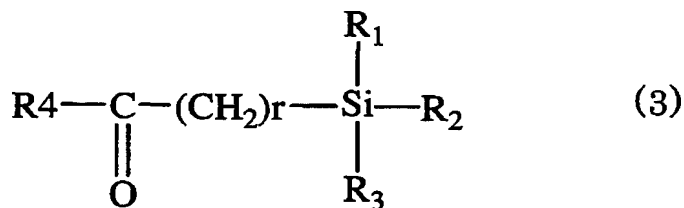
で示されるアミノ基含有シラン化合物が好ましく例示される。

[式中、R1、R2、R3は、同一または異なる $-(\text{CH}_2)_a\text{CH}_3$ またはClを表し、aは同一または異なる0から10の整数を表し、rは0から10の整数を表す。]

また、前記活性基含有カップリング剤として、下記一般式(3)

【0009】

【化33】

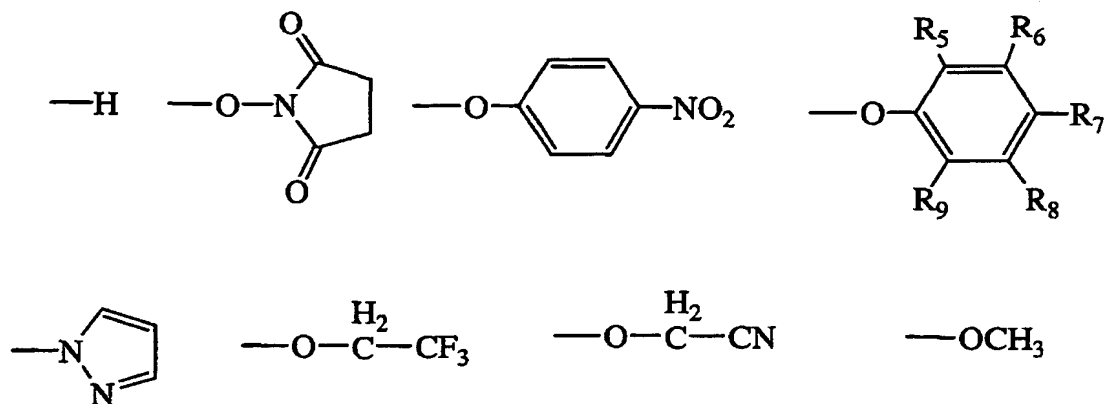


で示される活性基含有シラン化合物が、好ましく例示される。

[式中R4は以下のいずれかの構造を表す。

【0010】

【化 3 4】

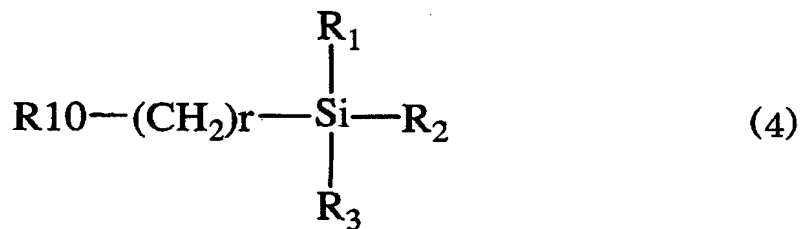


ここで、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 は同一または異なる H 、 Cl 、 F を表す。
。]

更に、前記活性基含有カップリング剤として、下記一般式（4）

【0011】

【化 3 5】

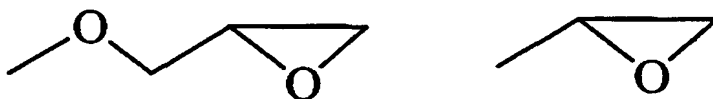


で示される活性基含有シラン化合物が好ましく例示される。

[式中、 R_{10} は以下のいずれかの構造を表す。]

【0012】

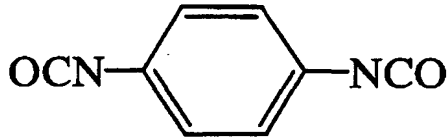
【化 3 6】



前記一般式（1）の架橋試薬 A—L—B として、以下のいずれかの化合物が好ましく例示される。

【0013】

【化 4 1】



【0 0 1 8】

【化 4 2】



【0 0 1 9】

第 2 に、本発明の基盤は、上記いずれかの基盤の、一般式 (1) の A-L-B で示される架橋試薬を介して、分子中に一級アミノ基を 2 個以上有する分枝剤が結合した基盤である。分子中の一級アミノ基の数は 2 個から 6 4 個程度まで広く用いることができる。

前記分枝剤として、下記一般式 (5)

【0 0 2 0】

【化 4 3】



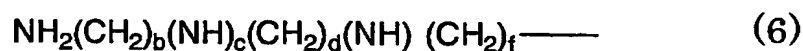
で示される一級アミノ基を 2 個又は 3 個有する化合物が好ましく例示される。

[式中、R 1 3、R 1 4、R 1 5 は同一または異なる一級アミノ基を有するアルキル基、アルキル基、水素原子から選ばれる。ただし、2 個又は 3 個は一級アミノ基を有するアルキル基である。]

ここで、前記一般式 (5) の R 1 3、R 1 4、R 1 5 が、下記一般式 (6)

【0 0 2 1】

【化 4 4】



で表されるアルキルアミノ基であることが好ましい。

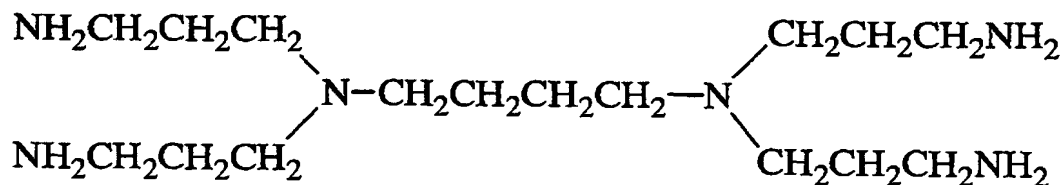
[式中、b、d、およびfは同一または異なる0から10の整数を表し、cおよびeは同一または異なる0または1の整数を表す。ただし、b、d、fがいずれも0になる場合は含まれない。]

【0022】

該分枝剤として、トリス（3-アミノプロピル）アミンとトリス（2-アミノエチル）アミンが特に好ましく例示される。また、下記式で表される4個の一級アミノ基を有するポリプロピレニミンテトラミンデンドリマーが好ましく例示される。

【0023】

【化45】



【0024】

また、前記分枝剤として、分子中に多数の一級アミノ基を有するPAMAM化合物が好ましく例示される。ここで、PAMAM化合物としては、分子中に8個の一級アミノ基を有するStarburst Generation 1（Aldrich社の商品名）や分子中に16個の一級アミノ基を有するStarburst Generation 2（Aldrich社の商品名）が例示される。

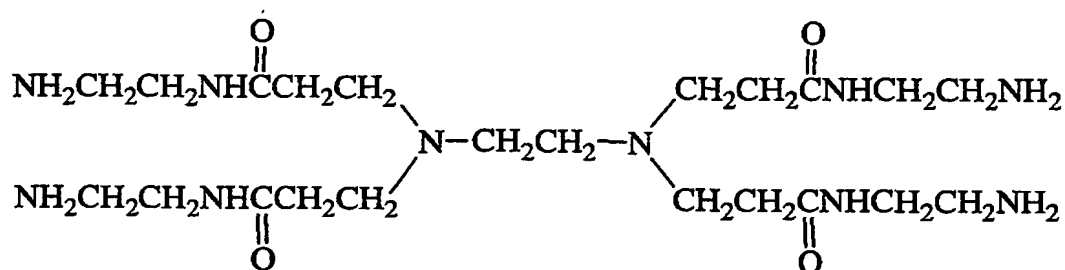
【0025】

更に、前記分枝剤が、2個以上の一級アミノ基を有するポリアミドデンドリマー化合物が好ましく例示される。ポリアミドデンドリマー化合物は、分枝鎖中にアミド基を有し、末端に一級アミノ基を有する化合物である。一級アミノ基を4，8，16，32，64個有するものがあり、それぞれGeneration 0.0，1.0，2.0，3.0，4.0（Aldrich社の商品名）と名づけられて入る。

4個の一級アミノ基を有するポリアミドデンドリマーとして、下記式のものが好ましく例示される。

【 0 0 2 6 】

【化 4 6】

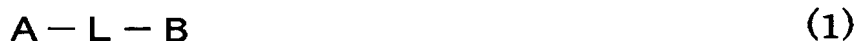


【 0 0 2 7 】

第 3 に、本発明の基盤は、上記第 2 の本発明の基盤の、分子中に一級アミノ基を 2 個以上有する分枝剤を介して、更に、下記一般式 (1)

【 0 0 2 8 】

【化 4 7】



の架橋試薬を結合させたことを特徴とする基盤である。

[式中、A および B は同一または異なる、活性エステル基、イソチオシアネート基、イソシアネート基、イミダゾール基、カルボジイミド基、アルデヒド基から選ばれ、上記活性基含有カップリング剤の活性基と反応する基を示す。L は A と B を連結する連結基であり、直鎖アルキル基、アリール基、アミド基を有するアルキル基から選ばれる。]

【 0 0 2 9 】

第 4 に、本発明は、上記いずれかに記載の基盤の、一般式 (1) A-L-B で示される架橋剤を介して、結合対象物である、核酸、タンパク質、糖、糖タンパク質、血液、体液等から選ばれる生体関連物質、または医薬品、環境ホルモン、PCB 等から選ばれる化学物質が固定化されることを特徴とする生体関連物質または化学物質固定化用基盤である。

【 0 0 3 0 】

第 5 に、本発明は、上記いずれかに記載の基盤に、核酸、タンパク質、糖、糖タンパク質、血液、体液等から選ばれる生体関連物質、または医薬品、環境ホル

モン、PCB等から選ばれる化学物質を固定化することを特徴とする生体関連物質または化学物質固定化方法である。

【0031】

第6に、本発明は、基盤上に活性基含有カップリング剤を反応させ、続いて、下記一般式(1)

【0032】

【化48】



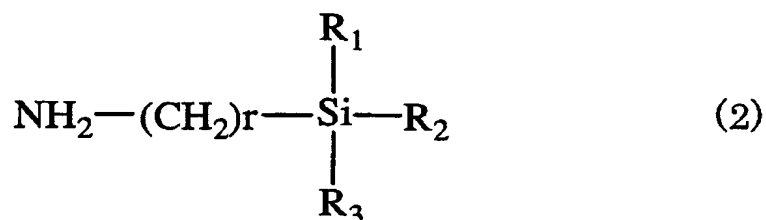
で示される架橋試薬を反応させることを特徴とする基盤のコーティング方法である。

[式中、AおよびBは同一または異なる、活性エステル基、イソチオシアネート基、イソシアネート基、イミダゾール基、カルボジイミド基、アルデヒド基から選ばれ、上記活性基含有カップリング剤の活性基と反応する基を示す。LはAとBを連結する連結基であり、直鎖アルキル基、アリール基、アミド基を有するアルキル基から選ばれる。]

前記活性基含有カップリング剤として、下記一般式(2)

【0033】

【化49】



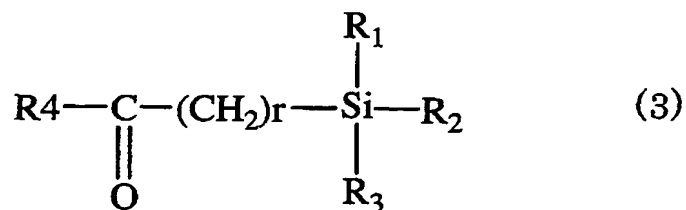
で示されるアミノ基含有シラン化合物が好ましく例示される。

[式中、R1、R2、R3は、同一または異なる $-O(CH_2)_aCH_3$ またはClを表し、aは同一または異なる0から10の整数を表し、rは0から10の整数を表す。]

また、前記活性基含有カップリング剤として、下記一般式(3)

【0034】

【化 5 0】



[式中、R10は以下のいずれかの構造を表す。]

【0037】

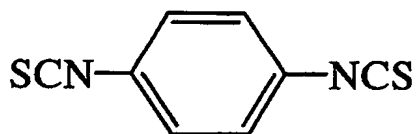
【化53】



前記一般式(1)の架橋試薬A-L-Bとして、以下のいずれかの化合物が好ましく例示される。

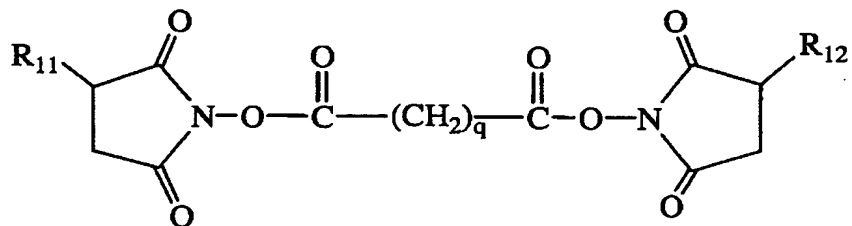
【0038】

【化54】



【0039】

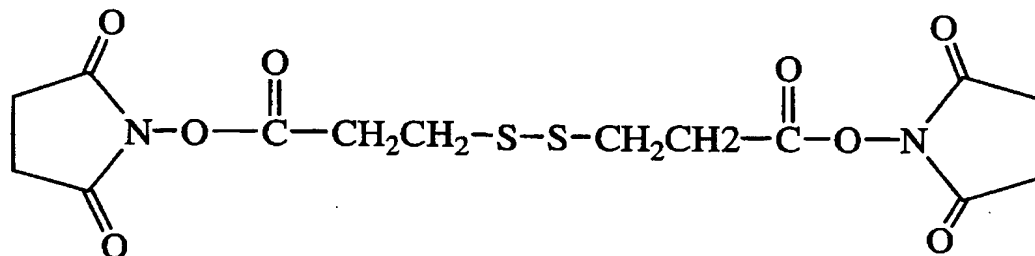
【化55】



[R11, R12は同一または異なる-Hまたは-SO₃]

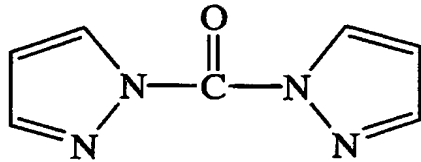
【0040】

【化56】



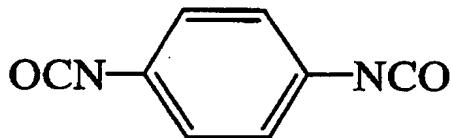
【 0 0 4 1 】

【化 5 7】



【 0 0 4 2 】

【化 5 8】



【 0 0 4 3 】

【化 5 9】



【 0 0 4 4 】

第 7 に、本発明は、上記第 6 の本発明で製造された基盤に対し、分子中に一級アミノ基を 2 個以上有する分枝剤を反応させたことを特徴とする基盤のコーティング方法である。

前記分枝剤として、下記一般式 (5)

【 0 0 4 5 】

【化 6 0】



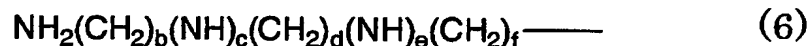
で示される一級アミノ基を 2 個又は 3 個有する化合物が好ましく例示される。

[式中、R 1 3、R 1 4、R 1 5 は同一または異なる一級アミノ基を有するアルキル基、アルキル基、水素原子から選ばれる。ただし、2 個又は 3 個は一級アミノ基を有するアルキル基である。]

ここで、前記一般式 (5) の R 1 3、R 1 4、R 1 5 が、下記一般式 (6)

【 0 0 4 6 】

【 化 6 1 】



で表されるアルキルアミノ基であることが好ましい。

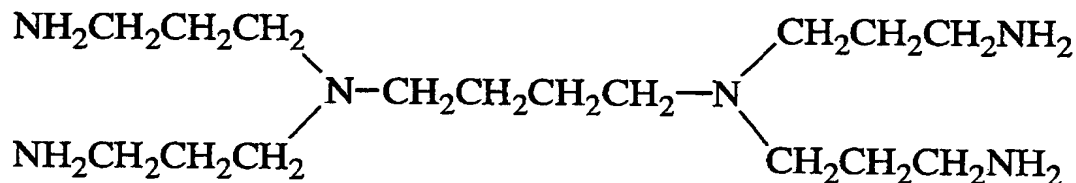
[式中、b、d、および f は同一または異なる 0 から 1 0 の整数を表し、c および e は同一または異なる 0 または 1 の整数を表す。ただし、b、d、f がいずれも 0 になる場合は含まれない。]

【 0 0 4 7 】

該分枝剤として、トリス (3 - アミノプロピル) アミンとトリス (2 - アミノエチル) アミンが特に好ましく例示される。また、下記式で表される 4 個の一級アミノ基を有するポリプロピレニミンテトラミンデンドリマーが好ましく例示される。

【 0 0 4 8 】

【 化 6 2 】



【 0 0 4 9 】

また、前記分枝剤として、分子中に多数の一級アミノ基を有する P AMAM 化合物が好ましく例示される。ここで、P AMAM 化合物としては、分子中に 8 個の一級アミノ基を有する Starburst Generation 1 (Aldrich 社の商品名) や分子中に 1 6 個の一級アミノ基を有する Starburst Generation 2 (Aldrich 社の商品名) が例示される。

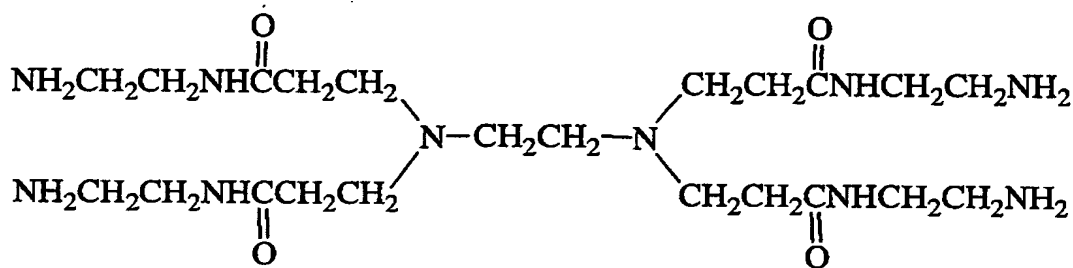
【 0 0 5 0 】

更に、前記分枝剤が、2 個以上の一級アミノ基を有するポリアミドデンドリマー化合物が好ましく例示される。ポリアミドデンドリマー化合物は、分枝鎖中に

アミド基を有し、末端に一級アミノ基を有する化合物である。一級アミノ基を 4, 8, 16, 32, 64 個有するものがあり、それぞれ Generation 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 (Aldrich 社の商品名) と名づけられている。4 個の一級アミノ基を有するポリアミドデンドリマーとして、下記式のものが好ましく例示される。

【0051】

【化 6 3】



【0052】

第 8 に、本発明は、上記第 7 の本発明で製造された基盤に対し、更に、下記一般式 (1)

【0053】

【化 6 4】

A-L-B

(1)

の架橋試薬を反応させたことを特徴とする基盤のコーティング方法である。

[式中、A および B は同一または異なる、活性エステル基、イソチオシアネート基、イソシアネート基、イミダゾール基、カルボジイミド基、アルデヒド基から選ばれ、上記活性基含有カップリング剤の活性基と反応する基を示す。L は A と B を連結する連結基であり、直鎖アルキル基、アリール基、アミド基を有するアルキル基から選ばれる。]

【0054】

本発明の基盤としては、ガラス、プラスチック等の平面基板、ガラス、プラスチック等で製造されたビーズなど、従来から生体関連物質や医薬品等の固定化用基盤として知られているものが用いられる。

図 1 ～ 図 3 に上記の本発明のフローを化学式で表す。

【 0 0 5 5 】

図 1 において、基盤（I）表面に存在する水酸基に活性基含有基含有カップリング剤としてアミノ基含有シラン化合物を反応させ（I I）、続いて、一般式（1） $A-L-B$ で表される連結基 L を有する架橋試薬を反応させている（I I I）。得られた基盤にオリゴ核酸を固定化している（V I）。

また、基盤（I I I）に対し、分枝剤である下記一般式（5）で示される一級アミノ基を 2 個又は 3 個有する化合物を反応させている（I V）。

【 0 0 5 6 】

【化 6 5】

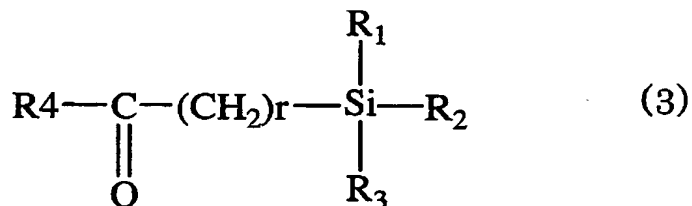


この分枝剤に対して、更に、一般式（1）の架橋試薬を反応させ（V）、1 個の架橋試薬に対し 2 個のオリゴ核酸が固定化されている。

図 2 及び 3 においては、基盤（I）表面に存在する水酸基に活性基含有基含有カップリング剤として、

【 0 0 5 7 】

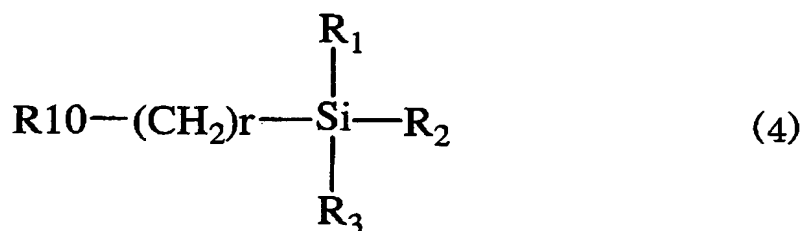
【化 6 6】



または

【 0 0 5 8 】

【化 6 7】



を反応させ (V I)、(V I I)、分子中に一級アミノ基を 2 個又は 3 個有する分枝剤である下記一般式 (5)

【0 0 5 9】

【化 6 8】



で示される化合物を反応させている (V I I I)、(I X)。

この分枝剤に対して、更に、一般式 (1) の架橋試薬を反応させ (V)、(X I)、それぞれ 1 個の架橋試薬に対し 2 個のオリゴ核酸が固定化されている。

【0 0 6 0】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施例を示す。図 4 は、本実施例の全体を示すスキームである。

実施例 1 スライドガラスの洗浄

スライドガラス (10 枚) を 1 0 % 水酸化ナトリウム水溶液 (2 0 0 m L) に 15 分間浸した後、水 (2 0 0 m L で 2 回)、1 % 塩酸水溶液 (2 0 0 m L)、水 (2 0 0 m L で 2 回) の順で洗浄した。メタノール (2 0 0 m L) に浸し 5 分間の超音波洗浄を行い、遠心によって乾燥させ、さらに 1 2 0 度で 2 時間減圧乾燥した。

【0 0 6 1】

実施例 2 アミノプロピルシラン化

乾燥させたスライドガラスを 3-アミノトリメトキシシラン (13 mL)、水 (8 mL)、メタノール (380 mL) 中に浸し、室温で少なくとも 5 時間攪拌させた。その後スライドガラスを取り出し、メタノール (200 mL) で 2 回洗浄して遠心後、120 度で 2 時間減圧乾燥させた。

【0062】

実施例 3 イソチオシアネート化

あらかじめ 1, 4-フェニレンジイソチオシアネート (1836 mg) を 10% ピリジン・ジメチルフォルムアミド溶液 (190 mL) に溶解させ、これに上記スライドガラスを入れ、室温下 16 時間攪拌させた。スライドガラスを取り出し、ジメチルフォルムアミド (200 mL)、ジクロロメタン (200 mL)、メタノール (200 mL) の順で洗浄し、減圧下室温で乾燥させ、実施例 5 のイソチオシアネート化に供した。

【0063】

実施例 4 デンドリマー化

デンドリマーとして PAMAM (Aldrich) を用い、以下の反応を行った。実施例 3 でアミノ化されたスライドガラスをガラス容器に敷き、そこに 10% PAMAM メタノール溶液 (130 μ L) を滴下し、密封して 37 度で 5 時間反応させた。その後スライドガラスをメタノール (200 mL) で 2 回、アセトン (200 mL) で 1 回洗浄し、減圧下室温で 1 時間乾燥させた。

【0064】

実施例 5 デンドリマーコーティング後のイソチオシアネート化

実施例 4 で得られた上記スライドガラスを、実施例 3 と同様の反応を行い、イソチオシアネート化し、オリゴヌクレオチドのスポットに供した。

【0065】

実施例 6 トリス (3-アミノプロピル) アミン化

実施例 3 で得られたスライドガラスをガラス容器に敷き、そこに 20 または 30% トリス (3-アミノプロピル) アミン・メタノール溶液 (130 μ L) を滴下し、密封して 37 度で 5 時間反応させた。その後スライドガラスをメタノール (200 mL) で 2 回、アセトン (200 mL) で 1 回洗浄し、減圧下室温で

1時間乾燥させた。

【 0 0 6 6 】

実施例 7 3-アミノプロピルアミンコーティング後のイソチオシアネート化

実施例 6 で得られた上記スライドガラスを、実施例 3 と同様の反応を行い、イソチオシアネート化し、これをオリゴヌクレオチドのスポットに供した。

【 0 0 6 7 】

実施例 8 ポリプロピレニミンテトラミン dendrimer 化

実施例 3 で得られたスライドガラスをガラス容器に敷き、そこに 2 0 または 3 0 % ポリプロピレニミンテトラミン dendrimer・メタノール溶液 (1 3 0 μ L) を滴下し、密封して 3 7 度で 5 時間反応させた。その後スライドガラスをメタノール (2 0 0 m L) で 2 回、アセトン (2 0 0 m L) で 1 回洗浄し、減圧下室温で 1 時間乾燥させた。

【 0 0 6 8 】

実施例 9 ポリプロピレニミンテトラミン dendrimer コーティング後のイソチオシアネート化

実施例 8 で得られた上記スライドガラスを、実施例 3 と同様の反応を行い、イソチオシアネート化し、これをオリゴヌクレオチドのスポットに供した。

【 0 0 6 9 】

実施例 1 0 オリゴヌクレオチドのスライドガラスへのスポットと結合反応

オリゴヌクレオチドライブラリー (8 0 p m o l ; M W G 社製) を滅菌水 (4 μ L) に溶解し、スポット溶液 (4 μ L ; 1 M 炭酸緩衝液 (p H 9 . 0) : 飽和 W a k o g e l C - 3 0 0 (和光純薬工業株式会社の商品名) 水溶液 = 1 : 1) と混合させ、スプッター (S P B I O 2 0 0 0 、日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社の商品名、SPBIOは登録商標) によって実施例 5 、 7 、 9 によって得られたコーティング済みスライドガラス上にスポットした。スポット後タイトボックスにろ紙を敷き、300 m M リン酸水素二ナトリウム水溶液を湿らせ、溶液が付かないようにスポット済みのスライドガラスを入れ、密閉後 3 7 $^{\circ}$ C で放置した。1 6 時間後タイトボックスからスライドガラスを取り出しドライオーブンに移し 6 0 $^{\circ}$ C で 1 5 分間加温した。

【 0 0 7 0 】

実施例 1 1 オリゴヌクレオチドスポットガラスのブロッキング

スライドガラスを 0. 1 % Triton X (2 0 0 m L) で室温 5 分間、0. 0 5 % 塩酸水溶液 (2 0 0 m L) で室温 2 分間、0. 1 M 塩化カリウム (2 0 0 m L) で室温 1 0 分間、滅菌水 (2 0 0 m L) で室温 1 分間洗浄した。

続いて 1 M トリス-グリシン溶液 (pH = 9. 0) にガラスを浸し、室温で 1 時間攪拌しブロッキングを行った。滅菌水で 2 回洗浄後、ドラフト内で乾燥させて冷蔵保存した。

【 0 0 7 1 】

(参考例) 逆転写反応

マウス肝臓由来の total RNA を用いた逆転写反応

マウス肝臓由来の total RNA (1 0 0 μ g) を逆転写反应用 oligo dT プライマー (2 μ L ; 0. 5 μ g / μ L) と滅菌水に溶解して全量を 3 0 μ L とし、これを 7 0 度で 5 分間、4 2 度で 2 分間加温した。その後あらかじめ調製しておいた色素を含む溶液 (5 0 μ L ; 逆転写反应用緩衝液 (\times 5、2 5 0 mM Tris-HCl pH8.3、375 mM KCl、15 mM $MgCl_2$ 、50 mM DTT : 1 6 μ L)、0. 1 M ジチオスレイトール (8 μ L)、1 0 \times d NTP 溶液 (8 μ L ; 2 mM d TTP、5 mM d ATP、5 mM d CTP、5 mM d GTP)、1 mM Cy3-dUTP または Cy5-dUTP (8 μ L)、RNase inhibitor (1 0 μ L ; 4 0 units / μ L)) を上記 RNA 溶液と混合し、続けて逆転写酵素 (1 μ L、2 0 0 units ; SuperScript II RNase H⁻ ; GIBCO BRL) を添加し 4 2 度で加温した。1 時間後、上記逆転写酵素 0. 5 μ L をさらに加え、4 2 度で 1 時間反応させた。この反応液に滅菌水 (4 0 μ L)、0. 5 M EDTA (1 0 μ L)、1 N NaOH (2 0 μ L) を加え、6 5 度で 3 0 分間加温し、1 N HCl (1 5 μ L) を加え中和し、氷冷した。エタノール沈殿を行った後、滅菌水 (5 0 μ L) を加え、Microcon P30 (B I O R A D 社の商品名) により脱塩した。溶出液を Speed Vac にて濃縮した。

【 0 0 7 2 】

実施例 1 2 マウス肝臓 total RNA から調製した cDNA とのハイブリダイゼ

ー シ ョ ン

参考例に従って調製された蛍光標識 c D N A に 20 X S S C (10 μ L) 、 10% S D S (0.4 μ L) 、 および滅菌水を加え全量 40 μ L のプローブ溶液を作成した。そのプローブ DNA 溶液を静かに D N A チップ上にのせた後、カバーガラスを溶液上にのせ、4 X S S C 溶液で湿らせたキムタオルを敷いたタイトボックス内に入れ、4 0 度で 1 6 時間放置した。

【 0 0 7 3 】

ハイブリダイゼーション後、チップを 1 X S S C - 0.05 % S D S 溶液 (2 0 0 m L , 4 0 度) に 1 0 分間、0.2 x S S C - 0.1 % S D S 溶液 (2 0 0 m L , 4 0 度) に 2 分間、続いて 0.2 x S S C (2 0 0 m L) 、 0.05 x S S C (2 0 0 m L) でそれぞれ室温で洗浄した。乾燥させた後、チップスキャナー (Scan Array、A Packard BioScience Company の商品名) で検出した。マウス肝臓由来の R N A を Cy3-dUTP または Cy5-dUTP で標識した c D N A を調製し、オリゴヌクレオチドチップによって解析した結果。緑色が Cy3、赤色が Cy5 の検出波長の結果であった。

【 0 0 7 4 】

実施例 1 3 オリゴヌクレオチドのスライドガラス上への固定化の確認

1 m M C y 5 - d U T P (2 μ L) 、 ジメチルスルフォキシド (4 μ L) 、 2 5 m M 塩化コバルト溶液 (4 μ L) 、 反応緩衝溶液 (x 5 、 1 M カコジル酸カリウム、 2 5 m M トリス - 塩酸、 1 . 2 5 m g / B S A 、 p H 6 . 6 ; 8 μ L) 、 ターミナルトランスフェラーゼ (5 0 u n i t s) に滅菌水を加えて全量 4 0 μ l とした反応溶液を調製後、直ちにスライドガラスに全量滴下した。カバーガラスを反応液上にのせ、37度で放置した。1 5 分後 4 X S S C 緩衝液 (0 . 6 M N a C l 、 0 . 1 2 M クエン酸二水和物) 、 0 . 1 % S D S 溶液、 5 0 % エタノール水溶液で洗浄し乾燥させ検出機 (スキャンアレイ) で測定した。

【 0 0 7 5 】

【発明の効果】

基盤を本発明のようにコーティングすることで、生体関連物質等をバックグラウンド値が低く、高密度に固定化することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のフローを示す化学式。

【図 2】

本発明のフローを示す化学式。

【図 3】

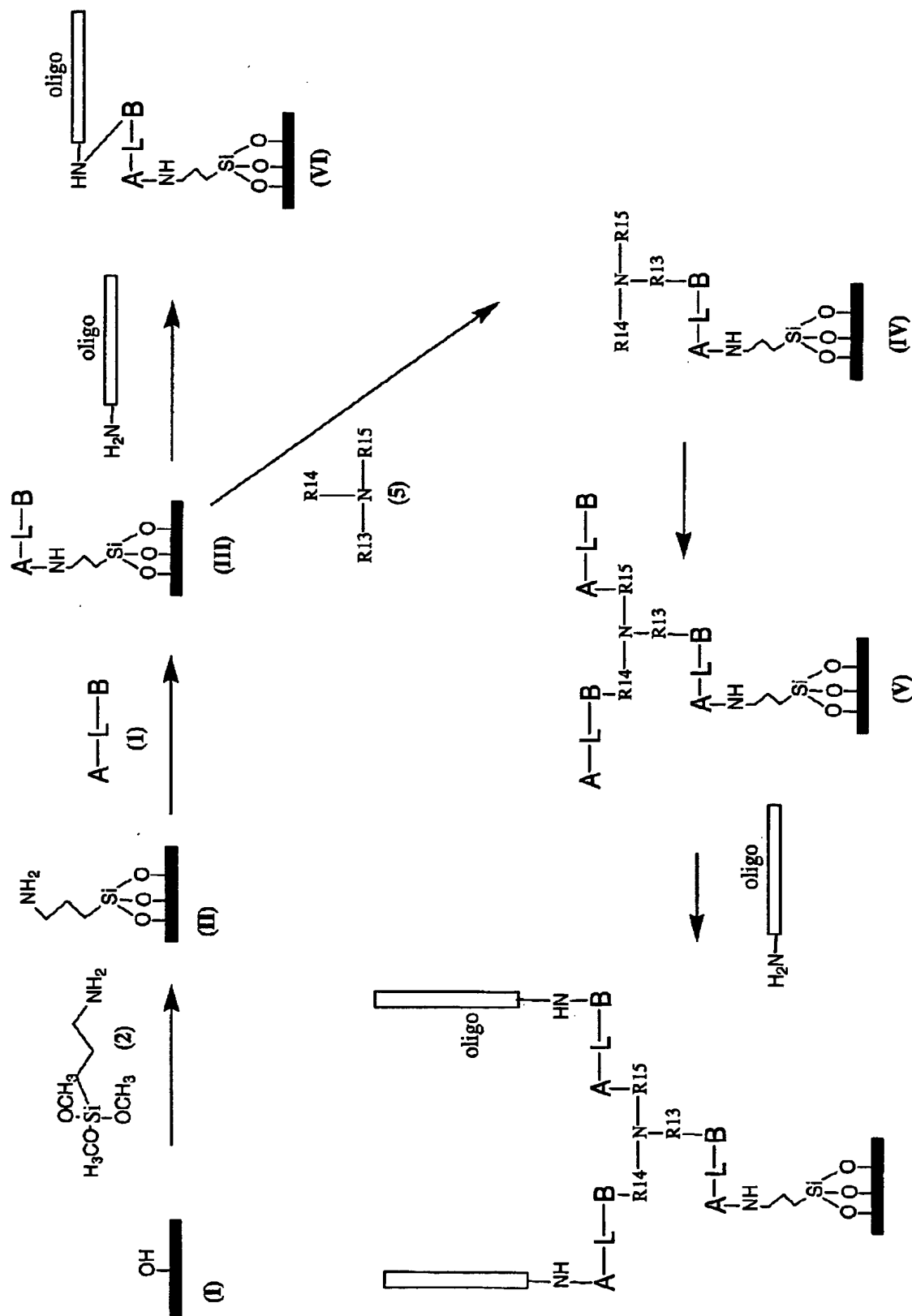
本発明のフローを示す化学式。

【図 4】

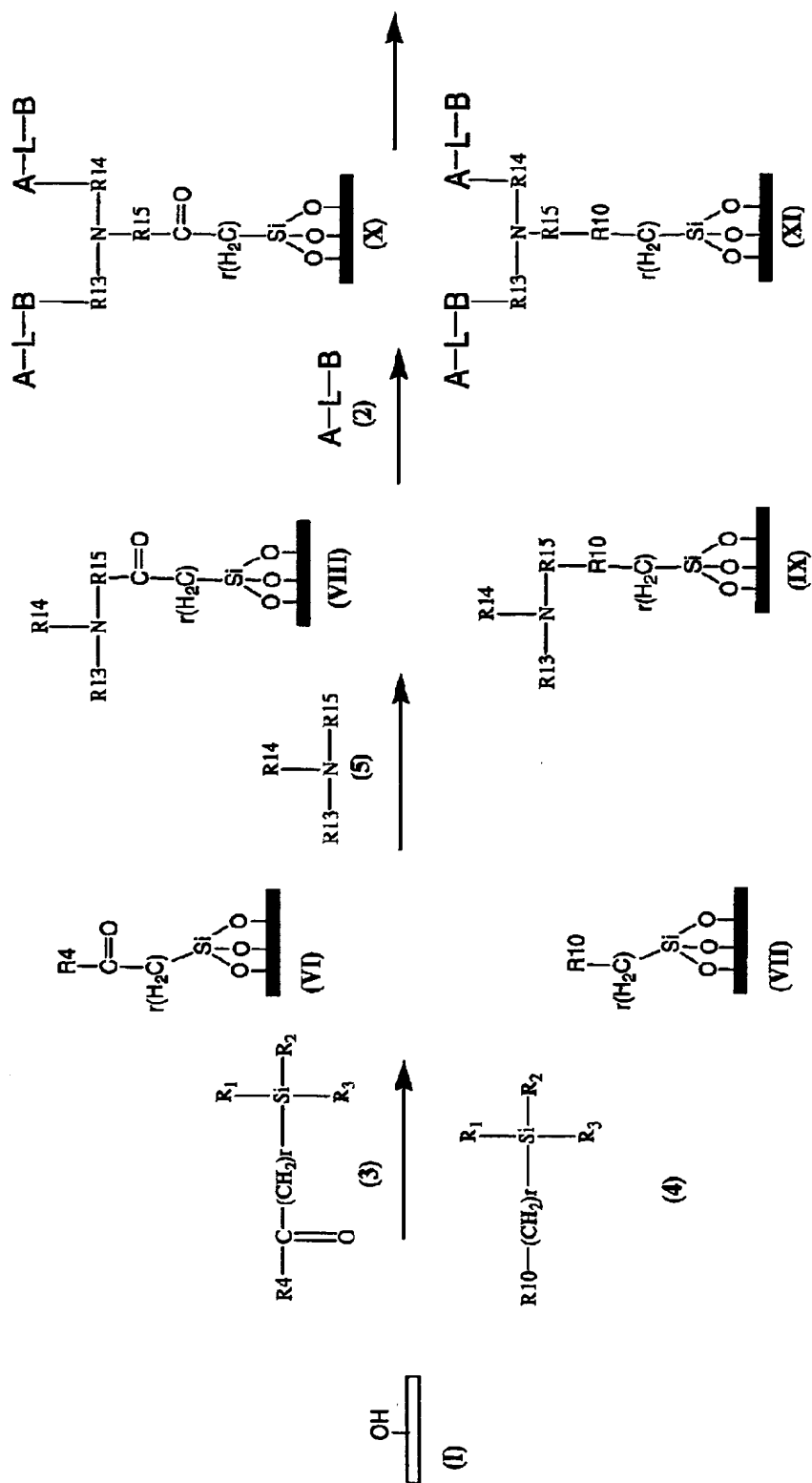
本発明の実施例を示すスキーム。

【書類名】 図面

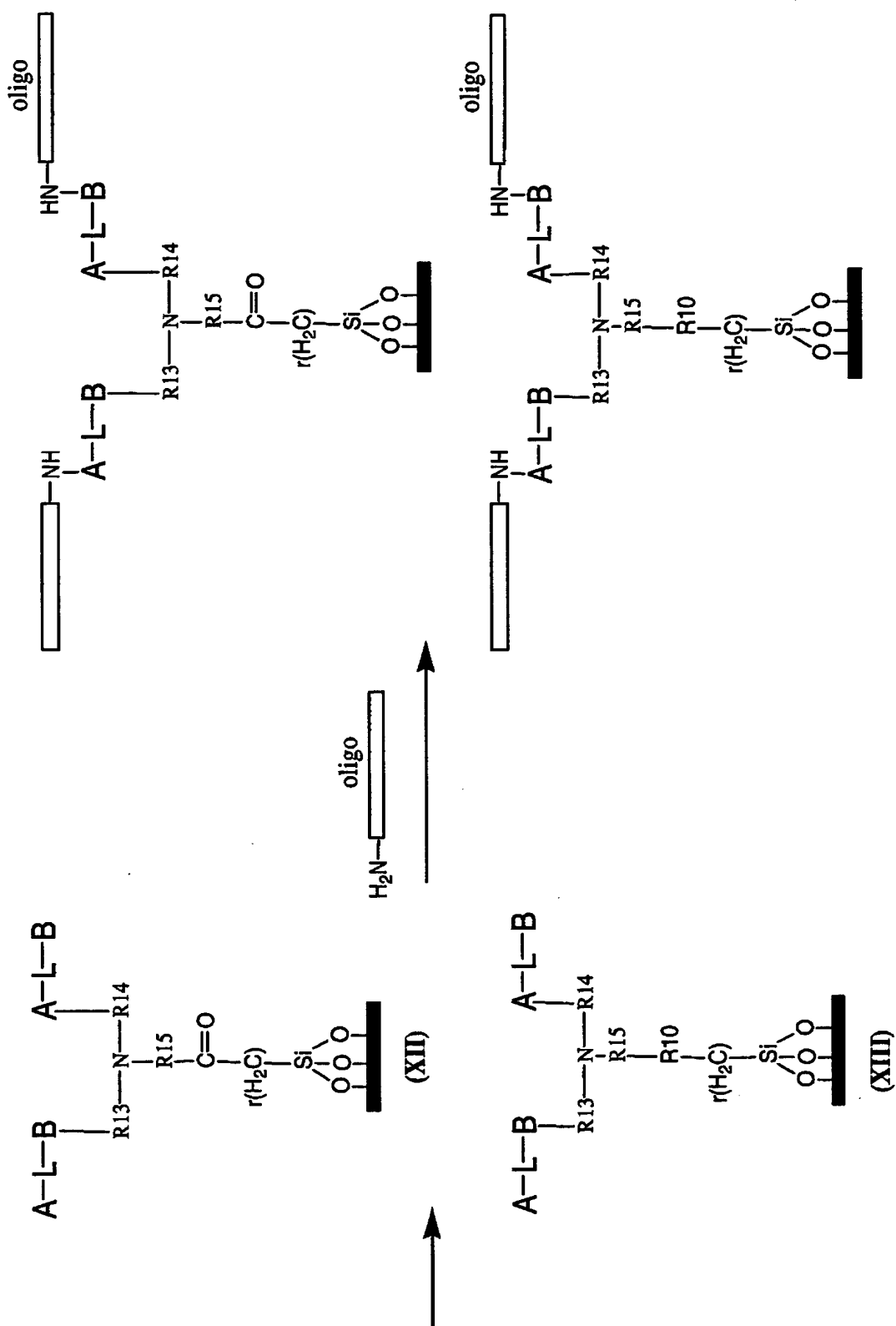
【図 1】



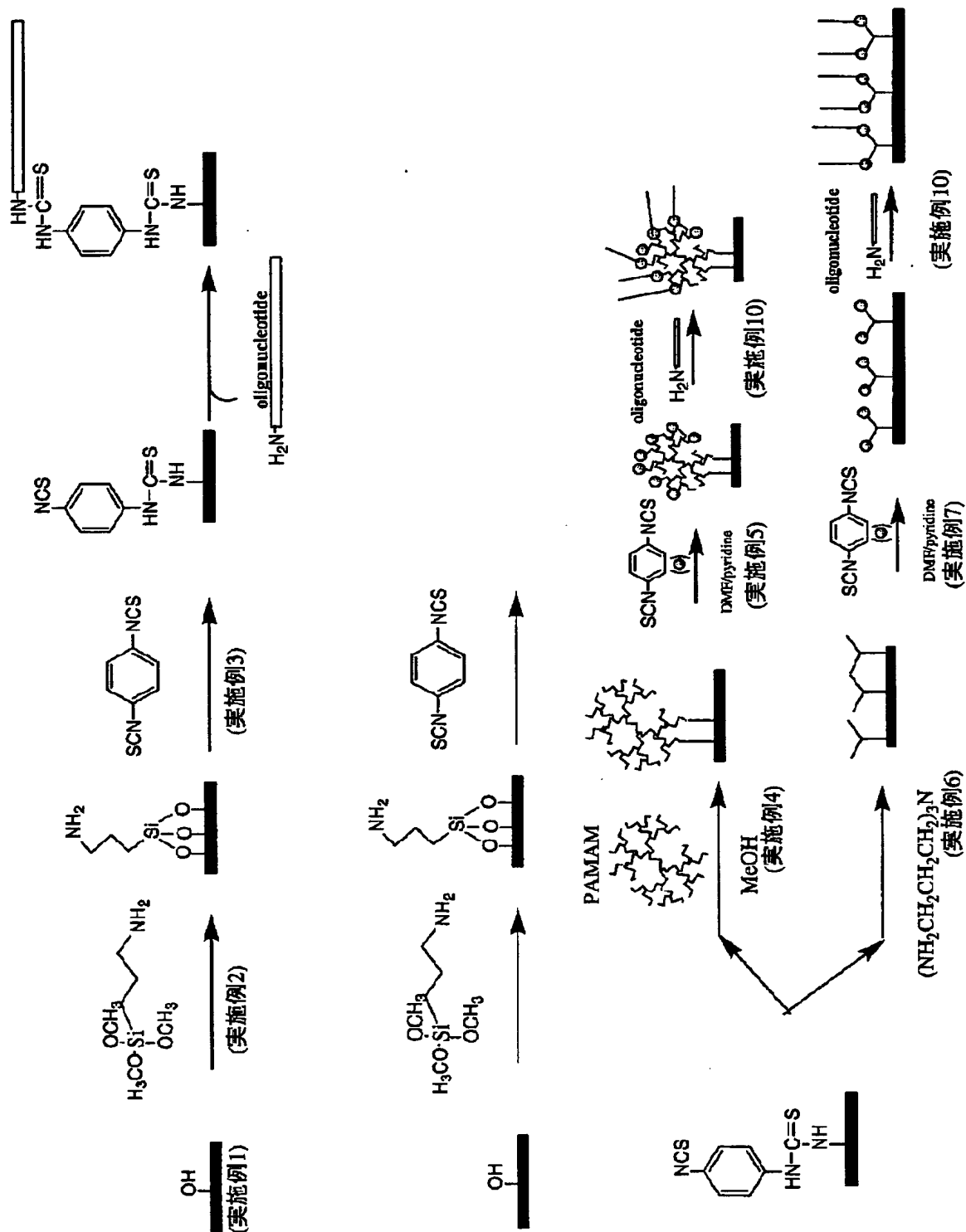
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体関連物質等をバックグラウンド値が低く、高密度に固定化するためのコーティングされた基盤を提供する。

【解決手段】 基盤上に活性基含有カップリング剤を介して、一般式 $A-L-B$ [式中、AおよびBは同一または異なる、活性エステル基、イソチオシアネート基、イソシアネート基、イミダゾール基、カルボジイミド基、アルデヒド基から選ばれ、上記活性基含有カップリング剤の活性基と反応する基を示す。LはAとBを連結する連結基であり、直鎖アルキル基、アリール基、アミド基を有するアルキル基から選ばれる。]で示される架橋試薬が結合した基盤。該基盤に生体関連物質等を固定化する。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 0 0 2 1 7 2]

1. 変更年月日	2 0 0 2 年 3 月 4 日
[変更理由]	住所変更
住 所	神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目 1 番地 4 3
氏 名	株式会社ディーエヌエイチップ研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日
[変更理由] 新規登録
住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社
2. 変更年月日 2002年10月11日
[変更理由] 住所変更
住 所 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目1番43
氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社